



Búsqueda de enzimas lipolíticas termoestables en una metagenoteca de aguas termales

**Procura de enzimas lipolíticas termoestables nunha metaxenoteca
de augas termais**

**Search of thermostable lipolytic enzymes in a hot spring
metagenomic library**

Autora: Alba Bueses Suárez

Director: Manuel Becerra Fernández



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

TRABALLO FIN DE GRAO

D. Manuel Becerra Fernández autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao "Búsqueda de enzimas lipolíticas termoestables en una metagenoteca de aguas termales" presentado por Alba Bueses Suárez para a súa defensa ante o tribunal calificador.

En A Coruña, a 8 de Setembro de 2016

**Manuel
Becerra
Fernández**

Firmado digitalmente por
Manuel Becerra Fernández
Nombre de reconocimiento
(DN): cn=Manuel Becerra
Fernández, o=Universidade
da Coruña, ou,
email=manu@udc.es, c=ES
Fecha: 2016.09.08 12:00:18
+02'00'

Asinado: Manuel Becerra Fernández

Abreviaturas y siglas:

- **A₂₆₀**: Absorbancia a 260nm.
- **A₂₈₀**: Absorbancia a 280nm.
- **ADN**: Ácido desoxirribonucleico.
- **APS**: Persulfato de amonio.
- **BSA**: Albúmina de suero bovino.
- **DO**: Densidad óptica.
- **EDTA**: Ácido etilendiaminotetraacético.
- **KDa**: Kilodalton.
- **LB**: Medio Luria Bertani.
- **M**: Molar.
- **pb**: Pares de bases.
- **pNPL**: Para-nitrofenil-laurato (12C).
- **SDS**: Dodecilsulfato sódico.
- **TB**: Thermus Broth, medio Luria Bertani con agua rica en carbonatos.
- **TEMED**: Tetrametil etilendiamina.
- **Tris**: Tris(hidroximetil)aminometano.
- **V**: Voltios.
- **4/5V**: 4 partes de volumen por cada 5.

Resumen

Las enzimas con actividad lipolítica termoestables presentan un gran potencial de uso en la industria biotecnológica siendo empleadas en la síntesis de biopolímeros, biodiesel, producción de fármacos y cosméticos entre otros productos. La búsqueda de actividad lipolítica en metagenotecas de aguas termales es de especial interés por la capacidad de estas enzimas de actuar en condiciones de altas temperaturas y otros factores extremos que pueden facilitar su uso en el ámbito industrial. En el presente trabajo, se transfirió el ADN de una metagenoteca elaborada en *Escherichia coli* a partir del manantial geotermal de Río Caldo (Ourense) a la cepa de *Thermus thermophilus* BL03, cepa que tiene deleccionadas las secuencias que codifican para enzimas con actividad lipolítica. Previamente, se determinó el agua que se debería usar para llevar a cabo los pasos de transformación y cultivo de *T. thermophilus*. Se extrajo el ADN de *E. coli*, se determinó su concentración y grado de pureza. Posteriormente, se realizó la transformación de *T. thermophilus* BL03 y se obtuvieron algunas colonias que produjeron halos alrededor de las mismas en placas con tributirina. Los candidatos que produjeron halo se sembraron en placas de medio mínimo con este mismo sustrato, en el que la cepa silvestre *T. thermophilus* HB27 es capaz de crecer, y la cepa mutada *T. thermophilus* BL03 sin transformar no. Las que crecieron en este medio se confirmaron como positivas. Finalmente, se procedió a caracterizar la temperatura óptima de las enzimas con actividad lipolítica. Se determinó que la temperatura óptima del primer candidato es de 80°C y la del segundo de 90°C o mayor.

Palabras clave: Metagenoteca, actividad lipolítica, *T. thermophilus*, aguas termales.

Resumo

As enzimas con actividade lipolítica termoestables presentan un gran potencial de uso na industria biotecnolóxica sendo empregadas na síntese de biopolímeros, biodiesel, produción de fármacos e cosméticos entre outros produtos. A procura de actividade lipolítica en metaxenotecas de augas termais é de especial interese pola capacidade destas enzimas de actuar en condicións de altas temperaturas e outros factores extremos que poden facilitar o seu uso no ámbito industrial. No presente traballo, transferiuse o ADN dunha metaxenoteca elaborada en *Escherichia coli* a partir do manantial xeotermal de Río Caldo (Ourense) á cepa de *Thermus thermophilus* BL03, cepa que ten deleccionadas as secuencias que codifican para enzimas con actividade lipolítica. Previamente, determinouse a auga que se debería usar para levar a cabo os pasos de transformación e cultivo de *T. thermophilus*. Extraeuse o ADN de *E. coli*, determinouse a súa concentración e grado de pureza. Posteriormente, realizouse a transformación de *T. thermophilus* BL03 e obtivéronse algunhas colonias que produciron halos ao redor das mesmas en placas con tributirina. Os candidatos que produciron halo pasáronse a placas de medio mínimo con este mesmo sustrato, no que a cepa silvestre *T. thermophilus* HB27 é capaz de crecer, e a cepa mutada *T. thermophilus* BL03 sen transformar non. As que creceron neste medio confirmáronse como positivas. Finalmente, procedeuse a caracterizar a temperatura óptima das enzimas con actividade lipolítica. Determinouse que a temperatura óptima do primeiro candidato é de 80°C e a do segundo de 90°C ou maior.

Palabras clave: Metaxenoteca, actividade lipolítica, *T. thermophilus*, augas termais.

Abstract

Lipolytic thermostable enzymes have great potential of use in the biotechnology industry being employed in the synthesis of biopolymers, biodiesel, production of pharmaceuticals and cosmetics, among other products. Search of thermostable lipolytic activity in hot springs metagenomics libraries has special interest for the capacity of these enzymes to operate at high temperature conditions and other extreme factors that can facilitate their industrial use. In this work, the DNA of a metagenomic library from the Río Caldo (Ourense) hot spring built in *Escherichia coli* was transferred to *Thermus thermophilus* BL03 strain, this strain has truncated the sequences encoding enzymes with lipolytic activity. Previously, It was determined the water that should be used to perform the steps of transformation and culture of *T. thermophilus*. Next, DNA from *E. coli* was extracted and its concentration and purity was determined. Subsequently, transformation of *T. thermophilus*

BL03 was performed and some colonies with halos around them on tributyrin plates were obtained. Halo candidates were plated on minimal medium with the same substrate, wherein the wild strain *T. thermophilus* HB27 is able to grow, and the mutated *T. thermophilus* BL03 strain untransformed cannot grow. Candidates that grew in this medium were confirmed as positive. Finally, a characterization of the optimal temperature of the enzymes with lipolytic activity was performed. Optimal temperature of one candidate was 80°C and the second candidate showed an optimal temperature of 90°C or greater.

Keywords: Metagenomic, lipolytic activity, *T. thermophilus*, hot springs.

Índice

1. Introducción	1
2. Objetivos	2
3. Materiales y métodos	2
3.1. Crecimiento en diferentes aguas	2
3.1.1. Material biológico y medios de cultivo	2
3.1.2. Medidas del pH	3
3.1.3. Cuantificación del crecimiento	3
3.2. Transformación de <i>T. thermophilus</i> BL03	3
3.2.1. Extracción del ADN	3
3.2.2. Cuantificación del ADN	5
3.2.3. Transformación en <i>T. thermophilus</i> BL03	5
3.3. Búsqueda y caracterización de actividad lipolítica	5
3.3.1. Medio mínimo	5
3.3.2. Preparación del extracto crudo	6
3.3.3. Método de Bradford	6
3.3.4. Ensayo de actividad lipolítica a diferentes temperaturas	7
3.3.5. Caracterización proteica en gel de poliacrilamida	7
4. Resultados y discusión	8
4.1. Crecimiento en diferentes aguas	8
4.2. Transformación de <i>T. thermophilus</i> BL03	10
4.3. Búsqueda y caracterización de actividad lipolítica	11
5. Conclusiones	13
6. Bibliografía	14

Índice de figuras

1.	Mapa del vector pCT3FK. El fósido es un vector lanzadera para <i>E. coli</i> (en el que es episomal, su número de copia es inducible y expresa resistencia a cloranfenicol) y para <i>T. thermophilus</i> (en el que es integrativo y expresa resistencia a kanamicina). <i>Kat</i> : kanamycin adenyl transferase (resistencia a kanamicina). <i>Chl^R</i> : chloramphenicol acetyl transferase (resistencia a cloranfenicol). <i>Hyp</i> : proteína hipotética. <i>pyrF'</i> : gen de la síntesis de pirimidina, empleado para guiar la integración homóloga en el genoma de <i>T. thermophilus</i> . <i>Eco72I</i> : Sitio de restricción único para obtener vector lineal.	4
2.	Densidad óptica a 600nm a las 2 horas, 4 horas y 6 horas de <i>T. thermophilus</i> creciendo en medio LB elaborado con distintas aguas.	9
3.	Candidatos resembrados de los transformantes obtenidos en placas con medio TB con tributirina y kanamicina a partir del DNA de los pocillos A5, A11, D4, E10 (dos candidatos) y F3.	11
4.	Porcentaje de actividad lipolítica obtenido, teniendo en cuenta el blanco, con respecto a la temperatura. Se consideró 100 % a la medida de actividad más alta alcanzada por cada muestra. Cada punto obtenido es la media de un triplicado. Se presentan también las barras de error estándar.	12
5.	Gel de poliacrilamida SDS-PAGE. M: Marcador de peso molecular (<i>NZY Colour Protein Marker II - NZYTech</i>); BL03: Cepa de <i>T. thermophilus</i> BL03; D4: Candidato D4; E10b: Candidato E10b.	13

Índice de tablas

1.	Composición del medio LB	3
2.	Composición de las distintas soluciones para extracción de ADN por lisis alcalina.	4
3.	Componentes del medio para búsqueda de actividad lipolítica.	5
4.	Composición de las placas de medio mínimo.	6
5.	Soluciones para realizar el ensayo de actividad a distintas temperaturas.	7
6.	Composición de los geles para la electroforesis de proteínas.	7
7.	Tampones para la electroforesis.	8
8.	Composición de las soluciones de tinción y destinción.	8
9.	Bicarbonatos, sodio, calcio y pH tras 15 días de la apertura de la botella de las diferentes aguas ensayadas. Los datos de As Burgas fueron tomados de la placa instalada junto al manantial (de un análisis realizado en 1990 por la Universidad de Santiago). Los datos de las aguas minerales comerciales, estaban indicados por la empresa que las comercializa en la etiqueta del producto. En todos los casos los valores de pH fueron determinados usando un pH-metro.	9
10.	Datos de concentración y grado de pureza del ADN extraído a partir de la metagenoteca de Río Caldo. En las cuadrículas de la izquierda bajo cada letra están las concentraciones de ADN en ng/ μ l, y en las cuadrículas de la derecha bajo cada letra en negrilla el grado de pureza del ADN de las muestras, que se calcula a partir de la absorbancia a 260 y 280nm. El guion indica que no se ha podido determinar con certeza el valor.	10
11.	Concentración de proteína total en el extracto crudo obtenido a partir de cada candidato.	11

1. Introducción

La metagenómica consiste en el estudio del genoma de todos los organismos presentes en una determinada muestra (Handelsman *et al.*, 1998), superando las limitaciones que implicaba la necesidad de obtener cultivos puros en laboratorio, de microorganismos muchas veces no cultivables (Hugenholtz & Tyson, 2008). Por ello se ha convertido en una de las tecnologías necesarias para acceder e investigar la gran cantidad de información presente en estos microorganismos inaccesibles hasta ahora (Handelsman, 2004; Pettit, 2004; Streit & Schmitz, 2004). Esta estrategia permite determinar qué géneros y especies están representados en una muestra ambiental (la estructura de una comunidad de microorganismos), así como esclarecer las funciones (el potencial metabólico) de estos microorganismos dentro de la comunidad (Hugenholtz & Tyson, 2008; Schmeisser *et al.*, 2007; Sharon & Banfield, 2013).

Según la aproximación para estudiar los metagenomas, distinguimos dos vertientes de la metagenómica: la primera está basada en la secuenciación del ADN extraído con el objetivo de encontrar linajes evolutivos o transcribir proteínas, entre otros; la segunda se basa en la función, y consiste en la búsqueda de actividades enzimáticas mediante la expresión del material genético en vectores de clonación empleando hospedadores heterólogos fácilmente manipulables en laboratorio (Angelov *et al.*, 2009; Handelsman *et al.*, 1998). Ambas estrategias han ido encontrándose con diversos obstáculos que ha sido necesario sortear mediante la optimización de las herramientas y protocolos disponibles con el fin de descubrir nuevos productos (Ekkers *et al.*, 2012; Steele *et al.*, 2009).

En la actualidad existe un amplio rango de ambientes para los que se han construido bibliotecas metagenómicas (metagenotecas), con la intención de explotar el potencial metabólico de los microorganismos presentes, tales como estudios de suelos (Biver & Vandenbol, 2013; Katz *et al.*, 2015), ambientes marinos (Venter *et al.*, 2004) y ambientes extremos, como el Ártico (Jeon *et al.*, 2009), hielo de glaciares (Simon *et al.*, 2009) y aguas termales (López-López *et al.*, 2015; Rhee *et al.*, 2005). Estos últimos son de especial interés ya que proporcionan una herramienta de acceso a los microorganismos extremófilos y sus mecanismos enzimáticos especialmente adaptados a dichos ambientes, cuyas características resultan de interés para diversos procesos industriales (Demirjian *et al.*, 2001).

Entre los extremófilos, cabe destacar los organismos termófilos, capaces de crecer a altas temperaturas. En general, sus enzimas conservan actividad a temperaturas elevadas y son más resistentes a otros factores ambientales (como pH, detergentes o metabolitos tóxicos) que las producidas por organismos mesófilos (Frock & Kelly, 2012; Schmidt-Dannert *et al.*, 1996). Para llevar a cabo estudios de este tipo de enzimas de origen termófilo se necesitan hospedadores específicos capaces de cultivarse en las condiciones en las que queremos que la enzima funcione, por ello, a pesar de que la mayoría de los estudios de metagenómica se han desarrollado en otros microorganismos, como por ejemplo *Escherichia coli* (Ekkers *et al.*, 2012; Schmeisser *et al.*, 2007), para estas enzimas se necesita un hospedador termófilo. Como hospedador termófilo destaca *Thermus thermophilus* por su mecanismo de competencia (Carr *et al.*, 2015; Henne *et al.*, 2004; Koyama *et al.*, 1986). Además su genoma ha sido completamente secuenciado y está bien caracterizado (Henne *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2015).

La cepa de *T. thermophilus* BL03 es un mutante creado a partir de *T. thermophilus* HB27, generándole múltiples deleciones de secuencias que codifican para esterases y lipasas (Leis *et al.*, 2014). Esta cepa puede ser empleada para llevar a cabo la identificación de enzimas con actividad lipolítica en metagenotecas de aguas termales. Las enzimas con actividad

lipolítica termostables tienen un gran potencial en la biotecnología y en la industria, aplicándose en la síntesis de biopolímeros o biodiesel y la producción de fármacos, agroquímicos, cosméticos, etc. (Rhee *et al.*, 2005). Se han hecho diversos estudios en busca de nuevas enzimas con actividad lipolítica o métodos para la detección de esta actividad desde hace tiempo, como es el caso de Kouker & Jaeger ya en 1987. Pero desde entonces, y gracias a la metagenómica se ha ampliado y facilitado la búsqueda, dando lugar a que gran número de grupos hayan encontrado nuevas enzimas lipolíticas, como es el caso de: Biver & Vandenbol, 2013; Glogauer *et al.*, 2011; Hardeman & Sjöling, 2006; Lee *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2005; Selvin *et al.*, 2012. También se han hallado enzimas lipolíticas termostables a bajas temperaturas (Jiménez *et al.*, 2012; Roh & Villatte, 2008).

En base a esto, en este trabajo, se ha procedido a la búsqueda de nuevas enzimas con actividad lipolítica en la comunidad microbiana de las aguas termales de Río Caldo, Ourense (Galicia). La metagenoteca, construida por el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC de estas aguas, ha sido el punto de partida para la búsqueda de enzimas lipolíticas y termoestables a altas temperaturas en *T. thermophilus* BL03 basada en la capacidad de crecer en medios con tributirina.

2. Objetivos

- Evaluación de la capacidad de crecimiento de *Thermus thermophilus* en diferentes aguas para su empleo en experimentos posteriores.
- Transferencia, mediante transformación, de una metagenoteca construida previamente a partir del ADN de una muestra ambiental de Río Caldo en la bacteria mesófila *Escherichia coli*, al hospedador termófilo *Thermus thermophilus* BL03.
- Análisis de la presencia de actividad lipolítica en la nueva metagenoteca mediante ensayos en placa con sustrato tributirina (observación de halos) y comprobación de la capacidad de crecimiento en medio mínimo con un único sustrato lipídico.
- Caracterización de la temperatura óptima de las enzimas encontradas a partir de extractos crudos obtenidos de cultivos de los candidatos con actividad lipolítica previamente identificados.

3. Materiales y métodos

3.1. Crecimiento en diferentes aguas

3.1.1. Material biológico y medios de cultivo

Se transfirieron colonias aisladas de *Thermus thermophilus* HB27 (cepa silvestre, ATCCBAA-163, DMS 7039, proporcionada por el Doctor J. Berenguer de la Universidad Autónoma de Madrid) a matraces con medio LB (Luria Bertani) (Tabla 1), empleando en cada caso un agua distinta para disolver los componentes: agua destilada, agua del manantial As Burgas (Ourense) y aguas minerales naturales comerciales: Evión, Lanjarón, Mondariz, Fontecelta, Sierra Cazorla, Fuente Primavera y Nestlé Aquarel. Todos los cultivos se realizaron durante 24h con una relación de volumen 1:7 respecto a la capacidad del matraz, agitación (150rpm) para permitir una aireación suficiente y a una temperatura de 70°C.

Tabla 1: Composición del medio LB

Compuesto	Concentración (p/v)
Bactotripton	1 %
Extracto de levadura	0,5 %
<i>NaCl</i>	0,5 %

3.1.2. Medidas del pH

Se determinó el pH de las aguas minerales comerciales, así como el del agua del manantial de As Burgas y el del agua destilada, empleando un equipo pH-metro microPH 2001 (CRISON, Barcelona, España).

3.1.3. Cuantificación del crecimiento

Se determinó el crecimiento de los cultivos realizando medidas de la densidad óptica a 600nm (DO_{600}) tras 2 horas, 4 horas y 6 horas, empleando un espectrofotómetro BioSpectrometer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3.2. Transformación de *T. thermophilus* BL03

3.2.1. Extracción del ADN

Para la realización de este trabajo se partió de una metagenoteca de aguas del manantial geotermal de Río Caldo (Lobios, Ourense) previamente disponible en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la UDC. Este manantial presenta una temperatura de surgencia de 76°C y un pH de 8,2. La extracción de ADN, a partir de 25L de las aguas del manantial, se realizó empleando el kit comercial *Metagenomic DNA isolation kit for water* (Epicentre Biotechnologies), basado en un método químico y enzimático para la extracción de ADN con alto peso molecular, con roturas aleatorias que dan lugar mayoritariamente a fragmentos de aproximadamente 40kb. Para construir la metagenoteca procedente de Río Caldo se emplearon componentes y procedimientos del kit comercial *CopyControl fosmid library production kit* (Epicentre Biotechnologies), pero utilizando el fósido pCT3FK (Figura 1), cedido amablemente por su autor, el Dr. A. Angelov (Angelov *et al.*, 2009). Este fósido es un vector lanzadera *Escherichia coli/Thermus thermophilus*, y está basado en el fósido comercial pCC1FOS. Contiene un origen de replicación de copia única y es inducible a alto número de copias. Confiere resistencia a cloranfenicol y contiene un casete de resistencia a kanamicina termoestable. Los clones se transfirieron a placas de 96 pocillos (aproximadamente unos 1000 clones por pocillo), usando únicamente 92 de los 96 pocillos, para conservarlos como un stock en glicerol.

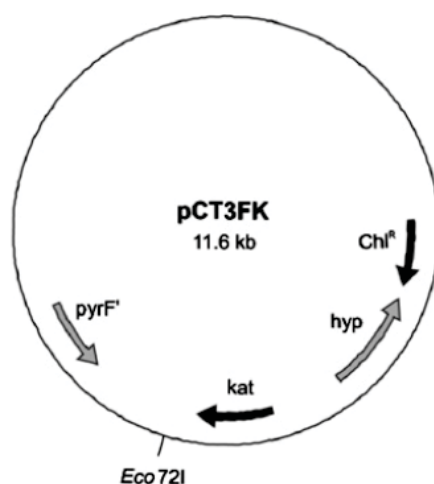


Figura 1: Mapa del vector pCT3FK. El fósido es un vector lanzadera para *E. coli* (en el que es episomal, su número de copia es inducible y expresa resistencia a cloranfenicol) y para *T. thermophilus* (en el que es integrativo y expresa resistencia a kanamicina). *Kat*: kanamycin adenyl transferase (resistencia a kanamicina). *Chl^R*: chloramphenicol acetyl transferase (resistencia a cloranfenicol). *Hyp*: proteína hipotética. *pyrF'*: gen de la síntesis de pirimidina, empleado para guiar la integración homóloga en el genoma de *T. thermophilus*. *Eco72I*: Sitio de restricción único para obtener vector lineal.

La extracción de los vectores (minipreps) se realizó empleando el método de lisis alcalina (Tabla 2). En primer lugar se inocularon 10 μ L de cada pocillo que contenían las células de la metagenoteca en 200 μ L de LB suplementado con 12,5 μ g/mL de cloranfenicol. La incubación se realizó durante 24h a 37°C en agitación. A continuación, se emplea 1 μ L del preinóculo para iniciar cultivos en tubos Falcon estériles con 5mL de LB suplementado con 12,5 μ g/mL de cloranfenicol y arabinosa al 0,02 %, para inducir el alto número de copias del vector, durante una noche a 37°C en agitación.

Tabla 2: Composición de las distintas soluciones para extracción de ADN por lisis alcalina.

Solución 1	Solución 2	Solución 3
Glucosa 50mM	NaOH 0,2M	Acetato potásico pH4,8 (Potasio 3M - Ácido Acético Glacial 5M)
EDTA 10mM	SDS 1 %	
Tris-HCl (pH8) 25mM		

Las células se centrifugaron a 5000rpm, y el precipitado se resuspendió en 150 μ L de solución 1 (previamente enfriada en hielo). A continuación se añadieron 200 μ L de solución 2 para provocar la lisis celular y desnaturalización del ADN cromosómico y de las proteínas. Por último se precipitaron los restos celulares y moléculas desnaturalizadas añadiendo 300 μ L de solución 3. A continuación se centrifuga a 13000rpm durante 5 minutos y se recupera el sobrenadante. Se procedió a precipitar el ADN añadiendo 1 mL de etanol 95 % frío manteniendo la muestra en hielo. Tras 5 minutos se centrifugó la muestra con etanol a 13000rpm durante otros 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Se repitió la precipitación, en esta ocasión empleando etanol al 70 % frío. El precipitado, que contenía el ADN, se secó en un desecador al vacío y se resuspendió en un volumen final de 50 μ L de agua destilada estéril.

3.2.2. Cuantificación del ADN

Se determinó la concentración del ADN extraído mediante las minipreps empleando un equipo BioSpectrometer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los datos se obtuvieron correlacionando la concentración de ADN con la absorbancia a una longitud de onda de 260nm, y se determinó el grado de pureza con la relación de las absorbancias: A_{260}/A_{280} (Manchester, 1995).

3.2.3. Transformación en *T. thermophilus* BL03

La transformación se lleva a cabo siguiendo el método descrito por Angelov *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. En resumen, *T. thermophilus* BL03 se crece a 70°C en 500mL de TB hasta que alcanza una DO_{600} de 0,8. TB son las siglas de *Thermus Broth*, que es como se refiere Angelov *et al.* (2009) al LB modificado con agua que tiene alto contenido en carbonatos. A continuación, se añaden 5 μ L de miniprep a 2mL del cultivo para cada pocillo. Se mantiene en agitación (250rpm) a 70°C durante 3-4h. Finalmente se siembran 100 μ L de cada tubo en cada placa de Petri, con un medio que contiene tributirina previamente preparadas (Tabla 3), lo que hace un total de 92 placas, que se incuban a 65°C en atmósfera húmeda de 2 a 3 días. La presencia de tributirina como sustrato en el medio permite identificar la presencia de actividad lipolítica, que se ve evidenciada por la formación de halos claros alrededor de las colonias positivas para dicha actividad.

Tabla 3: Componentes del medio para búsqueda de actividad lipolítica.

Compuesto	Concentración
Peptona	5g/L
Extracto de levaduras	3g/L
Goma arábica	10g/L
Tributirina	10 %
Agar	13g/L
Kanamicina	20 μ g/mL

3.3. Búsqueda y caracterización de actividad lipolítica

3.3.1. Medio mínimo

Se preparan placas de medio mínimo con tributirina (Leis *et al.*, 2014) (Tabla 4) para resembrar las colonias que se obtengan de la etapa previa, para cerciorarse de si son positivos concluyentes. Se siembran como control positivo y negativo *T. thermophilus* HB27 y *T. thermophilus* BL03 sin transformar, respectivamente. Se dejan en incubadora con atmósfera húmeda a 60°C.

Tabla 4: Composición de las placas de medio mínimo.

Compuesto	Concentración
$CaCl_2 - 2H_2O$	170 μ M
$CuSO_4 - 5H_2O$	0,1 μ M
$FeSO_4 - 7H_2O$	21,6 μ M
$MgCl_2 - 6H_2O$	615 μ M
$MnCl_2 - 4H_2O$	2,4 μ M
$NaMoO_4 - 2H_2O$	5 μ M
$NiCl_2 - 6H_2O$	0,1 μ M
$ZnSO_4 - 7H_2O$	0,2 μ M
Biotina	0,2mg/l
Tiamina	2mg/l
Tributirina	1 %
K_2HPO_4	0,7g/l
KH_2PO_4	0,25g/l
$(NH_4)_2SO_4$	2,5g/l
Casamino ácidos	5g/l
Agar	15g/l
$NaCl$	2g/l

3.3.2. Preparación del extracto crudo

Para determinar la actividad lipolítica se relizaron extractos crudos a partir de cultivos. Se inició un cultivo a partir de una colonia aislada de cada uno de los candidatos en 20mL de TB suplementado con kanamicina a 60°C 2 días en agitación. Entonces se toman los 20mL de cultivo y se pasan a tubos Falcon y se centrifugan en centrífuga refrigerada a 4°C, a 5000rpm durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 4mL de agua MiliQ (bidestilada) (de ser necesario se repetirá este paso para lavar el medio). Tras el lavado se centrifuga a 5000rpm 5 minutos, se desecha el sobrenadante y se resuspende con 16mL (4/5V) de tampón de sonicador (Tris 50mM, EDTA 25mM y NaCl 25mM, pH8). Se somete a la acción del sonicador, que produce ultrasonidos que rompen las membranas celulares, liberando el contenido intracelular. Para ello se debe tener la muestra siempre en hielo, pues los ultrasonidos producen calor que pueden desnaturalizar las proteínas cuya actividad queremos medir. El programa que se emplea tiene una amplitud del 100 %, y pulsos de 2 segundos, con 8 segundos de pausa, que se repiten hasta que hayan pasado 5 minutos de acción de ultrasonidos (2"ON-8"OFF). Tras la sonicación se centrifugan las muestras a 2500rpm durante 15 minutos, y se distribuye el sobrenadante, que es el extracto crudo, en alícuotas. Aquellas que no se vayan a usar inmediatamente se guardan a -20°C.

3.3.3. Método de Bradford

Se incuban 10mL de muestra de extracto crudo con 200 μ L de reactivo de Bradford, que se compone de 5 partes de agua destilada por cada parte de *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Biorad, California, USA). Este compuesto provoca una reacción cuando interacciona con proteínas, y gracias a una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de BSA (albumina de suero bovino), se puede extrapolar la concentración de proteína de la muestra a partir de su absorbancia a 595nm (Bradford, 1976).

3.3.4. Ensayo de actividad lipolítica a diferentes temperaturas

Se midió la actividad lipolítica del extracto crudo sobre el sustrato para-nitrofenil-laurato (pNPL) (Fuciños *et al.*, 2005). Se realizaron diluciones de los extractos con el fin de igualar las concentraciones de proteína entre las muestras. Se incluyó un blanco sustituyendo la muestra por agua destilada estéril. En primer lugar se calentaron 400 μ L de tampón de reacción (Tabla 5) y 50 μ L de solución de sustrato (25mM pNPL disuelto en etanol absoluto) a la temperatura del ensayo durante 10 minutos en un bloque térmico. A continuación se añadieron 50 μ L de muestra y se desarrolló la reacción durante 30 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 125 μ L de solución de parada (Tabla 5). Las muestras se mantuvieron en hielo durante 15 minutos, tras lo cual se centrifugaron a 13000rpm durante 10 minutos para descartar el precipitado consistente en una fase lipídica (procedente de los ácidos grasos de 12 carbonos liberados en la reacción). Se tomaron 200 μ L de sobrenadante y se midió la absorbancia a 400nm en un espectrofotómetro (*Synergy H1 Hybrid Reader-BioTek*). Se realizaron triplicados de todas las muestras y duplicados de los blancos. Las temperaturas ensayadas fueron 50, 60, 70, 80 y 90°C.

Tabla 5: Soluciones para realizar el ensayo de actividad a distintas temperaturas.

TAMPÓN DE REACCIÓN		SOLUCIÓN DE PARADA	
Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
Tris	50mM	Na_2CO_3	2M
$CaCl_2$	40mM		

3.3.5. Caracterización proteica en gel de poliacrilamida

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (*SDS-PAGE*, *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) que se compone de dos geles, con muestras de los distintos extractos crudos (Laemmli, 1970). El gel inicial, de concentración (*stacking*), tiene los poros de la matriz de mayor tamaño debido a una menor concentración de poliacrilamida, y un pH más ácido, y sirve para concentrar las proteínas en lo que se llama frente de migración. El segundo gel, de separación, tiene un tamaño de poro menor, lo que provoca que las proteínas se muevan en función de su tamaño (Tabla 6).

Tabla 6: Composición de los geles para la electroforesis de proteínas.

GEL DE CONCENTRACIÓN		GEL DE SEPARACIÓN	
Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad
Acrilamida	0,85mL	Acrilamida	3,33mL
TRIS 1M	0,65mL	TRIS 1,5M	2,5mL
H_2O	3,475mL	H_2O	4,05mL
SDS	25 μ L	SDS	50 μ L
APS	20 μ L	APS	50 μ L
TEMED	5 μ L	TEMED	20 μ L

Se prepara un tampón de carga para añadir a la muestra antes de proceder a su aplicación en el gel (Tabla 7), en una proporción de 6 μ L de tampón por cada 14 μ L de muestra, y se deja la mezcla 5 minutos a 95°C para que tenga lugar la desnaturalización. Con el marcador de peso molecular *NZY Colour Protein Marker II* (NZYTech, Lisboa, Portugal) este paso no será necesario. También se prepara un tampón de electroforesis, reutilizable, en el que estará sumergido el gel (Tabla 7).

Tabla 7: Tampones para la electroforesis.

TAMPÓN DE CARGA		TAMPÓN DE ELECTROFORESIS	
Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad (1L)
SDS 10 %	400 μ L	Glicina	14,4g
Glicerol	200 μ L		
Tris HCl 1M pH6,8	120 μ L	Tris-HCl	3g
Azul de bromofenol 0.1 %	20 μ L		
H ₂ O	160 μ L	SDS	1g
β -mercaptoetanol	100 μ L		

Cuando está todo listo se somete a un voltaje de 150V, y se espera aproximadamente 1h. Si se observa que el frente de migración está al límite del gel, se detiene el voltaje y se extrae el gel, que se pasará a una cubeta en la que se lavará con agua destilada. Posteriormente al lavado se sustituye el agua destilada por la solución de tinción, se calienta 30 segundos en el microondas y se deja tiñendo en agitación durante 10 a 15 minutos. Tras realizar la tinción se sustituye la solución de tinción por la solución de destinción y se repiten todos los pasos llevados a cabo con la primera solución. Pasados estos 15 minutos se retira la solución y se lava nuevamente el gel con agua destilada (Tabla 8).

Tabla 8: Composición de las soluciones de tinción y destinción.

SOLUCIÓN DE TINCIÓN		SOLUCIÓN DE DESTINCIÓN	
Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad
Coomassie Brilliant Blue	25mg	Ácido acético	10mL
Ácido acético	10mL	H ₂ O	90mL
H ₂ O	90mL		

Por último, para observar el resultado del gel se visualiza mediante el uso de un transiluminador *Molecular Imager Gel Doc XR+* (BioRad, California, USA).

4. Resultados y discusión

4.1. Crecimiento en diferentes aguas

En primer lugar se hizo necesario determinar en qué agua crece mejor *Thermus thermophilus in vitro* con el objetivo de realizar los experimentos posteriores de transformación, cultivo y detección de actividad lipolítica. Se realizó una caracterización preliminar de diferentes aguas comerciales, así como agua del manantial geotermal de As Burgas (Ourense) y agua bidestilada. Para ello se determinó su pH y se anotó su concentración de bicarbonatos, sodio y calcio. En el caso de las aguas comerciales las concentraciones de sus componentes se encontraban indicadas en la etiqueta y en el caso del agua de As Burgas se encuentran reflejadas en una placa que se haya en el propio manantial (Tabla 9).

Tabla 9: Bicarbonatos, sodio, calcio y pH tras 15 días de la apertura de la botella de las diferentes aguas ensayadas. Los datos de As Burgas fueron tomados de la placa instalada junto al manantial (de un análisis realizado en 1990 por la Universidad de Santiago). Los datos de las aguas minerales comerciales, estaban indicados por la empresa que las comercializa en la etiqueta del producto. En todos los casos los valores de pH fueron determinados usando un pH-metro.

Aguas	pH	Bicarbonatos (mL/L)	Sodio (mL/L)	Calcio (mL/L)
As Burgas	6,94	462	102,2	11,2
Evián	6,39	360	6,5	80
Lanjarón	6,47	131	5,5	26,6
Mondariz	6,43	160	47,7	6,6
Fontecelta	6,67	257	91,4	17,6
Sierra Cazorla	6,38	408,7	1,26	78,6
Fuente primavera	6,39	297,2	18,6	88,7
Aquarel	6,58	13,2	4,7	2,2
Agua destilada	6,57	0	0	0

Se puede observar (Tabla 9) que los valores más elevados de pH, bicarbonatos y sodio son los presentes en el agua de As Burgas. Presentando el agua comercial Fuente Primavera los valores más elevados de calcio. Con la intención de determinar si la composición del agua afecta al crecimiento de *T. thermophilus*, y en cual crece mejor, se realizó el ensayo de crecimiento con las 9 aguas, entre ellas agua destilada y agua de As Burgas, determinando las diferencias de crecimiento midiendo la DO a 600nm (Figura 2).

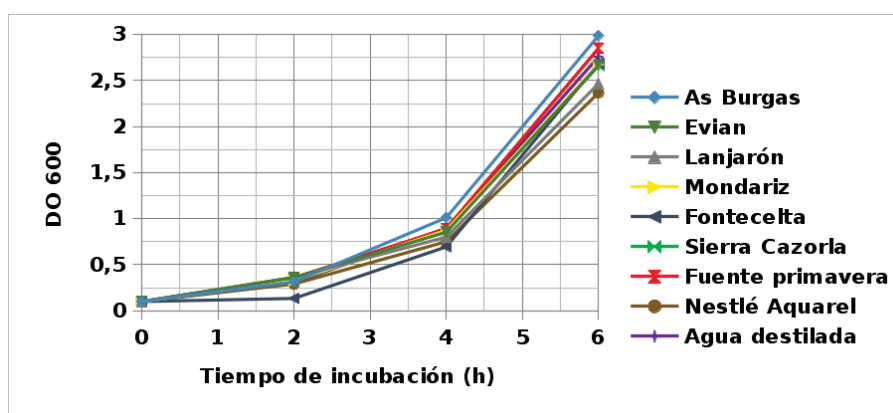


Figura 2: Densidad óptica a 600nm a las 2 horas, 4 horas y 6 horas de *T. thermophilus* creciendo en medio LB elaborado con distintas aguas.

Aunque no parece haber diferencias significativas en el crecimiento mostrado utilizando las diferentes aguas ensayadas, se observa una ligera mejoría en el crecimiento cuando *T. thermophilus* crece en un medio de cultivo elaborado con agua de As Burgas.

Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que las concentraciones de bicarbonatos, sodio y calcio no parecen tener efecto sobre el crecimiento de *T. thermophilus*. Sin embargo, de Grado *et al.* (1999) observaron que se obtenían mejores resultados de transformación en aguas minerales ricas en carbonatos, y por ello se determinó llevar a cabo los procedimientos con agua de As Burgas que, como se ha comentado, es la que presenta mayor concentración de bicarbonatos, además de tener menor coste y de ser donde se encuentra de manera natural *T. thermophilus*.

4.2. Transformación de *T. thermophilus* BL03

Tras la extracción del ADN de cada uno de los 92 pocillos que contenía la metagenoteca de Río Caldo elaborada en *Escherichia coli*, siguiendo el método indicado en materiales y métodos, se procedió a cuantificar la concentración y el grado de pureza del ADN plasmídico. Fue necesario medir estas magnitudes para confirmar que se hallaban dentro de los límites para llevar a cabo la transformación (Tabla 10). Los límites de concentración adecuados para transformar a *Thermus* fueron señalados por Angelov *et al.* (2009), y son de entre 40 y 1000ng/ μ L de ADN. Por otro lado para que el grado de pureza del ADN sea óptimo, su ratio de A_{260}/A_{280} debe ser mayor que 1,8 (Manchester, 1995).

Tabla 10: Datos de concentración y grado de pureza del ADN extraído a partir de la metagenoteca de Río Caldo. En las cuadrículas de la izquierda bajo cada letra están las concentraciones de ADN en ng/ μ L, y en las cuadrículas de la derecha bajo cada letra en negrilla el grado de pureza del ADN de las muestras, que se calcula a partir de la absorbancia a 260 y 280nm. El guion indica que no se ha podido determinar con certeza el valor.

	A		B		C		D	
1	205,3	2,13	432,3	2,1	2,3	2,06	120,5	2,16
2	-	-	268	2,1	17,2	2,08	196,8	2
3	245	1,9	275,3	-	12	1,79	84,7	-
4	216,9	2,1	218,5	2	18,3	2,38	233,2	-
5	-	-	17,7	2,04	7,4	2,08	159,7	2,15
6	8,7	1,98	115,4	2,03	11	2,27	92,2	1,95
7	126,5	2,06	167,8	2,15	9,7	3,71	188,3	1,91
8	134,7	1,97	58,5	2,09	26,5	2,05	65,6	2,07
9	544,4	1,99	156,1	2,1	239,4	2,12	179	2,08
10	-	-	188,1	2	298,5	2,13	345,1	2,09
11	367,7	2,13	182,2	1,99	153,7	2,01	178,5	1,95
12	300,5	2,01	-	-	214,8	2,14	123,3	1,94
	E		F		G		H	
1	376,9	2,15	170,7	2,05	154,2	2,08	70,2	2,01
2	363,5	2,03	-	-	143,9	2,11	-	-
3	581,6	2,03	163,1	2,1	147,8	1,94	464,3	2,12
4	243,3	2,1	134,9	2,11	9,5	1,91	108,6	2,13
5	434,3	2,09	105,4	2,06	77,8	1,85	221,4	2,05
6	396,9	2,13	93	-	89,9	2,06	125,2	2,14
7	359,7	2,11	39	2,13	-	-	83,9	1,8
8	401,6	2,05	39,2	2,03	-	-	90,5	2,06
9	732	-	-	-	35,8	2,14	-	-
10	248,5	-	175,8	2,06	52,9	2,13	38,5	2,21
11	218,8	2,1	-	-	39,8	2,09	-	-
Media	181,85				2,08			

Puede observarse en la Tabla 10 que la mayor parte de los datos de concentración se encuentran en el rango adecuado, estando por debajo de éste solo los de los pocillos A6, C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, F7, F8, G9, G11 y H10. Por su parte el grado de pureza sobrepasa el nivel mínimo en casi todos los pocillos, con la única excepción del pocillo C3.

Tras las extracciones del ADN y su cuantificación se llevó a cabo la transformación de *T. thermophilus* BL03 con el ADN de los 92 pocillos por separado, y se sembraron 100 μ L de cada una de las transformaciones en cada una de las 92 placas de medio TB con tributirina y kanamicina. Tras 2 o 3 días se comprobaba el crecimiento de colonias y la formación de halos.

Debido al bajo índice de eficiencia de transformación conseguido este experimento se repitió hasta en 3 ocasiones llegando al resultado final de una colonia positiva en cada una de las placas de A5, A11, D4 y F3, y 2 en la placa de E10, dando un total de 6 colonias que crecieron y formaron halo (Figura 3).



Figura 3: Candidatos resembrados de los transformantes obtenidos en placas con medio TB con tributirina y kanamicina a partir del DNA de los pocillos A5, A11, D4, E10 (dos candidatos) y F3.

4.3. Búsqueda y caracterización de actividad lipolítica

Al sembrar en medio mínimo con tributirina los candidatos que presentaban halo en las placas de medio general con tributirina y kanamicina, nos encontramos con que no se obtuvo ningún tipo de crecimiento en el control negativo (*T. thermophilus* BL03), pero si un pequeño crecimiento en el control positivo (*T. thermophilus* HB27) y en los candidatos D4 y E10b. Estos resultados respaldan la capacidad de la cepa silvestre, *T. thermophilus* HB27, de emplear tributirina para su crecimiento gracias a sus enzimas endógenas, confirman además que la cepa mutada es incapaz de hacerlo y, por último, indican la existencia de enzimas lipolíticas codificadas en el ADN de la genoteca introducida en el hospedador. Así pues, se consideraron los candidatos que crecían en el medio general con tributirina y no en este medio mínimo, como falsos positivos. Para realizar una caracterización preliminar de las enzimas codificadas por los candidatos seleccionados de la metagenoteca, se procedió a la obtención del extracto crudo (de los dos candidatos y de la cepa *T. thermophilus* BL03 sin transformar para usos posteriores). La cantidad de proteína total obtenida se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Los valores de absorbancia obtenidos de los dos candidatos se despejaron de la recta patrón realizada con BSA para obtener la concentración de proteína total (Tabla 11).

Tabla 11: Concentración de proteína total en el extracto crudo obtenido a partir de cada candidato.

Muestra	Concentración (mg/mL)
Candidato D4	0,28
Candidato E10b	0,33

Se diluyó el candidato E10b para obtener la misma concentración que el candidato D4 y partir de la misma cantidad de proteína total al realizar el ensayo de actividad a diferentes

temperaturas. En dicho ensayo, descrito en el apartado de materiales y métodos, se pudo observar como variaban los resultados a distintas temperaturas (Figura 4).

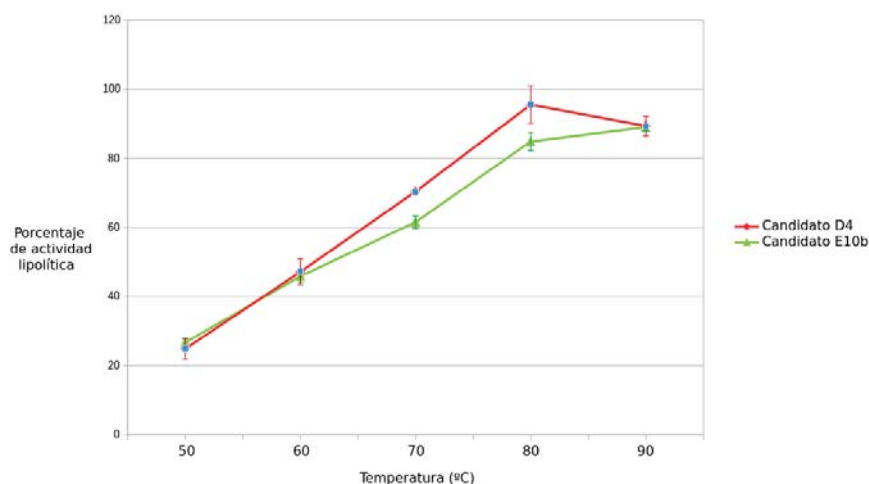


Figura 4: Porcentaje de actividad lipolítica obtenido, teniendo en cuenta el blanco, con respecto a la temperatura. Se consideró 100 % a la medida de actividad más alta alcanzada por cada muestra. Cada punto obtenido es la media de un triplicado. Se presentan también las barras de error estándar.

Gracias a la baja variabilidad en la mayoría de los datos obtenidos, nos encontramos en general con unas barras de error estándar pequeñas. Este experimento nos permitió determinar que la temperatura óptima para ensayar la actividad lipolítica en el candidato D4 es a 80°C, mientras que el candidato E10b presenta mayor actividad lipolítica cuando se ensaya a 90°C.

Finalmente, con el objetivo de determinar si existía una banda de expresión clara en los dos candidatos con respecto a la cepa control (BL03 sin transformar) que nos permitiese además calcular el peso molecular de las proteínas con actividad lipolítica expresadas en los dos candidatos, se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE en el que se cargaron muestras de los extractos crudos de BL03 y los dos candidatos, así como un marcador de peso molecular (*NZY Colour Protein Marker II* de la casa comercial NZYTech) (Figura 5).

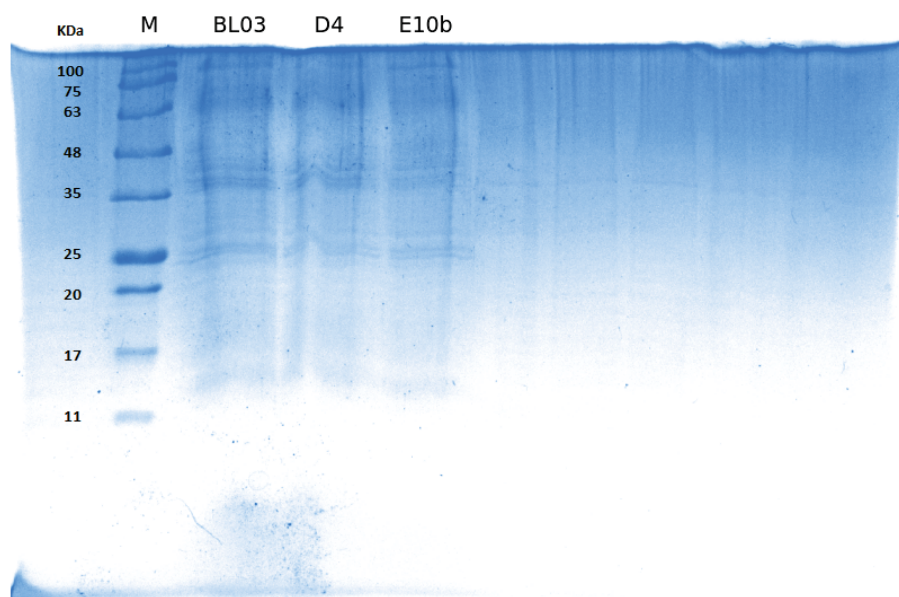


Figura 5: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE. M: Marcador de peso molecular (*NZY Colour Protein Marker II* - NZYTech); BL03: Cepa de *T. thermophilus* BL03; D4: Candidato D4; E10b: Candidato E10b.

Lamentablemente, en el gel de SDS-PAGE, no se observó ninguna banda de expresión clara entre el control (BL03) y los dos candidatos. Se hace necesario purificar las proteínas con actividad lipolítica para tratar de realizar una mejor caracterización.

5. Conclusiones

- El crecimiento de *Thermus thermophilus* no parece verse afectado por las distintas aguas ensayadas: comerciales, agua destilada y agua del manantial geotermal de As Burgas (Ourense).
- La extracción del ADN de cada uno de los pocillos de la placa de 92 pocillos que contenía la metagenoteca de Río Caldo elaborada en *Escherichia coli* ha sido efectiva, obteniéndose cantidades variables de ADN plasmídico que nos ha permitido llevar a cabo la transformación de *Thermus thermophilus*.
- La transformación de *T. thermophilus* con el ADN extraído previamente y posterior siembra en placas con medio TB con tributirina y kanamicina dio lugar a seis colonias con presencia de halo.
- Dos de los seis candidatos obtenidos con actividad lipolítica se confirmaron como positivos tras crecer en medio mínimo con tributirina.
- La temperatura óptima de actividad lipolítica de uno de los candidatos obtenidos es de 80°C, mientras que del segundo candidato es de 90°C o mayor.

Conclusión

- O crecemento de *Thermus thermophilus* non parece verse afectado polas distintas augas ensaiadas: comerciais, auga destilada e auga do manantial xeotermal das Burgas (Ourense).
- A extracción do ADN de cada un dos pocillos da placa de 92 pocillos que contiña a metaxenoteca de Río Caldo elaborada en *Escherichia coli* foi efectiva, obténdose cantidades variables de ADN plasmídico que nos permitiu levar a cabo a transformación de *Thermus thermophilus*.

- A transformación de *T. thermophilus* co ADN extraído previamente e posterior sembra en placas con medio TB con tributirina e kanamicina deu lugar a seis colonias con presenza de halo.
- Dous dos seis candidatos obtidos con actividade lipolítica confirmáronse como positivos tras crecer no medio mínimo con tributirina.
- A temperatura óptima de actividade lipolítica dun dos candidatos obtidos é de 80°C mentres que do segundo candidato é de 90°C ou maior.

Conclusions

- *Thermus thermophilus* growth does not seem to be affected by the different tested waters: commercial, distilled water and As Burgas (Ourense) hot spring.
- DNA extraction from each one of the wells of the 92 well plate containing the Río Caldo metagenomic library elaborated in *Escherichia coli* has been effective, obtaining different amounts of DNA plasmid that allowed us to carry out the transformation of *Thermus thermophilus*.
- *T. thermophilus* transformation with the previously extracted DNA and subsequent plating on TB medium with tributyrin and kanamycin resulted in six colonies with halo.
- Two of the six candidates obtained with lipolytic activity were confirmed as positive after growing in minimal medium with tributyrin.
- The optimum temperature of lipolytic activity of one of the candidates obtained is 80°C while the second candidate is 90°C or greater.

6. Bibliografía

- Angelov A, Mientus M, Liebl S, Liebl W. 2009. A two-host fosmid system for functional screening of (meta)genomic libraries from extreme thermophiles. *Systematic and Applied Microbiology* 32(3):177-185.
- Biver S, Vandenbol M. 2013. Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiol Biotechnol* 40(2):191-200.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the pinciple of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Carr JF, Danziger ME, Huang AL, Dahlberg AE, Gregory ST. 2015. Engineering the genome of *Thermus thermophilus* using a counterselectable marker. *Journal of Bacteriology* 197(6):1135-1144
- De Grado M, Castán P, Berenguer J. 1999. A high-transformation-efficiency cloning vector for *Thermus thermophilus*. *Plasmid* 42(3):241-245.
- Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy CS. 2001. Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology* 5(2):144-151.
- Ekkers DM, Cretoiu MS, Kielak AM, Elsas JD. 2012. The great screen anomaly-a new frontier in product discovery through functional metagenomic. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(3):1005-1020.
- Frock AD, Kelly RM. 2012. Extreme Thermophiles: Moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Engineering* 1(4):363-372.

- Fuciños P, Rúa ML, Longo MA, Sanromán MA, Pastrana L 2008. Thermal spring water enhances lipolytic activity in *Thermus thermophilus* HB27. *Proc.ess Biochemistry* 43(12):1383-1390.
- Glogauer A, Martini VP, Faoro H, Couto GH, Müller-Santos M, Monteiro, RA, Mitchell DA, De Souza EM, Pedrosa FO, Krieger N. 2011. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories* 10:54.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5(10):245-249.
- Handelsman J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(4):669-685.
- Hardeman F, Sjöling S. 2006. Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 59(2):524-534.
- Henne A, Brüggemann H, Raasch C, Wiezer A, Hartsch T, Liesegang H, Johann A, Lienard T, Gohl O, Martinez-Arias R, Jacobi C, Starkuviene V, Schlenczeck S, Dencker S, Huber R, Klenk HP, Kramer W, Merkl R, Gottschalk G, Fritz HJ. 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nature Biotechnology* 22(5):547-553.
- Hugenholtz P, Tyson GW. 2008. Metagenomics. *Nature* 455(7212):481-483.
- Jeon JH, Kim JT, Kang SG, Lee JH, Kim SJ. 2009. Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic sediment metagenome. *Marine Biotechnology* 11(3):307-316.
- Jiménez DJ, Montaña JS, Álvarez D, Baena Sandra. 2012. A novel cold active esterase derivedandean from Colombian high Andean forest soil metagenome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(1):361-370.
- Katz M, Hover BM, Brady SF. 2015. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. *Journal of Industrial Microbiol Biotechnol* 43(2-3):129-141.
- Kouker G, Jaeger KE. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. *Applied and Enviromental Microbiology* 53(1):211-213.
- Koyama Y, Hoshino T, Tomizuka N, Furukawa K. 1986. Genetic transformation of the thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. *Journal of Bacteriology* 166(1):338-340.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Lee SW, Won K, Lim HK, Kim JC, Choi GJ, Cho KY. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6):720-726.
- Leis B, Angelov A, Li Haijuan, Liebl W. 2014. Genetic analysis of lipolytic activities in *Thermus thermophilus* HB27. *Journal of Biotechnology* 191:150-157.
- Li H, Angelov A, Pham VT, Leis B, Liebl W. 2015. Characterization of chromosomal and megaplasmid partitioning loci in *Thermus thermophilus* HB27. *BMC Genomics* 16(1):317.

- López-López O, Knapik K, Cerdán ME, González-Siso MI. 2015. Metagenomic of alkaline hot spring in Galicia (Spain): microbial diversity analysis and screening for novel lipolytic enzymes. *Frontiers in Microbiology* 6:1291.
- Manchester KL. 1995. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *BioTechniques* 19(2):208-210.
- Pettit RK. 2004. Soil DNA libraries for anticancer drug discovery. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 54(1):1-6
- Rhee JK, Ahn DG, Kim YG, Oh JW. 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormonesensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2):817-825.
- Roh C, Villatte F. 2008. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. *Journal of Applied Microbiology* 105(1):116-123.
- Selvin J, Kennedy J, Lejon DPH, Kiran GS, Dobson ADW. 2012. Isolation identification and biochemical characterization of a novel halo-tolerant lipase from the metagenome of the marine sponge *Haliclona simulans*. *Microbial Cell Factories* 11:72.
- Schmeisser C, Steele H, Streit WR. 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbe. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(5):955-962.
- Schmidt-Dannert C, Rúa ML, Atomi H, Schmid RD. 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid metabolism* 1301(1-2):105-114.
- Sharon I, Banfield JF. 2013. Microbiology. Genomes from Metagenomics. *Science* 342(6162):1057-1058.
- Simon C, Wiezer A, Strittmatter AW, Daniel R. 2009. Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23):7519-7526.
- Steele HL, Jaeger KE, Daniel R, Streit WR. 2009. Advances in recovery of novel biocatalysts from metagenomes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 16(1-2):25-37.
- Streit WR, Schmitz RA. 2004. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Current Opinion in Microbiology* 7(5):492-498.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304(5667):66-74.